

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-44473

(P2000-44473A)

(43)公開日 平成12年2月15日(2000.2.15)

(51)Int.Cl.⁷A 61 K 31/35
A 23 K 1/16
A 61 K 35/78
// C 07 D 311/62

識別記号

A F E
3 0 2

F I

A 61 K 31/35
A 23 K 1/16
A 61 K 35/78
C 07 D 311/62

テマコード(参考)

A F E 2 B 1 5 0
3 0 2 B 4 C 0 6 2
C 4 C 0 8 6
4 C 0 8 8

審査請求 未請求 請求項の数5 FD (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平10-225211

(22)出願日

平成10年7月27日(1998.7.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年2月8日発行
の中日新聞に掲載

(71)出願人 591039137

三井農林株式会社
東京都新宿区西新宿3-2-11

(71)出願人 590002389

静岡県
静岡県静岡市追手町9番6号

(72)発明者 桜井 美雪

静岡県藤枝市青葉町1丁目2-45 静岡県
家畜衛生研究所内

(72)発明者 原 征彦

静岡県藤枝市南駿河台2-1-7

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 家畜のウイルス感染予防剤

(57)【要約】

【課題】 ヘルペスウイルス並びにコロナウイルスの感染を有効に阻止すると共に、生体に対して有害な副作用を示す心配のない薬剤を開発すること。

【解決手段】 茶ポリフェノールを有効成分として含有することを特徴とする家畜のヘルペスウイルスまたはコロナウイルス感染予防剤。

(2) 開2000-44473 (P2000-4H鏡)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 茶ポリフェノールを有効成分として含有することを特徴とする家畜のヘルペスウイルスまたはコロナウイルス感染予防剤。

【請求項2】 ヘルペスウイルスが、オーエスキーボウイルスまたは牛伝染性鼻気管炎ウイルスである請求項1記載のウイルス感染予防剤。

【請求項3】 コロナウイルスが、豚伝染性胃腸炎ウイルスまたは豚流行性下痢ウイルスである請求項1記載のウイルス感染予防剤。

【請求項4】 請求項1記載のウイルス感染予防剤を、家畜の飼料または飲み水に加えて家畜に投与することを特徴とする家畜のウイルス感染予防法。

【請求項5】 請求項1記載のウイルス感染予防剤を、家畜の皮膚に散布することを特徴とする家畜のウイルス感染予防法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、家畜のウイルス感染予防剤に関し、詳しくは家畜のヘルペスウイルスまたはコロナウイルス感染予防剤に関する。さらに、家畜のウイルス感染予防方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】オーエスキーボウイルスは、ヘルペスウイルスの一種によって引き起こされる伝染病で、豚、牛、羊、犬、猫等が感染する。豚以外の動物は感染後、短時日で死亡するが、豚は比較的抵抗性があり、特に成豚は軽症あるいは無症状で耐過することが多い。また、牛伝染性鼻気管炎は、同じヘルペスウイルス科のウイルスの感染によって起こる伝染病で、牛の呼吸器症状を主徴とするものである。

【0003】これらの伝染病の感染を予防するための薬剤として、各種のワクチンが開発されている。しかしながら、ワクチンを用いて免疫賦与（ワクチネーション）した場合、発病は阻止し得るが、感染を阻止し得ないことが明らかにされている。いずれの感染症についても、原因となるヘルペスウイルスの感染を完全に阻止する薬剤は未だ見出されていない。

【0004】なお、成豚は、前記したように、オーエスキーボウイルスに対し比較的抵抗性があるけれども、感染耐過した豚は、潜在的なキャリアーとなって、長期間にわたりウイルスあるいはウイルスゲノムを持ち続け、環境因子などによるストレスを受けると、潜在ウイルスが活性化して排出され、感染源になると考えられている。牛伝染性鼻気管炎に感染した牛の場合も、同様に潜在的なキャリアーとなり、豚と同様な経過で感染源になるものと考えられている。

【0005】上述した通り、両伝染病の感染は、ワクチネーションにより完全に阻止することは不可能と考えられていることから、これらウイルスの感染を有效地に阻止

し、さらに生体に対して有害な副作用をもたず、安心して使用できる薬剤の開発が望まれている。

【0006】一方、豚伝染性胃腸炎及び豚流行性下痢は、共にそれぞれ異なるコロナウイルスの一種により引き起こされる豚の伝染性の腸管感染症である。両者共に年齢に関係なく感染するが、若齢のものほど症状は強く、哺乳仔豚はしばしば高い死亡率を示す。

【0007】予防対策は、いずれの感染症についても、哺乳仔豚を強毒ウイルスから防御することを目的に実施されている。具体的には乳汁免疫法、すなわち母豚を免疫して乳汁中に抗体、主にIgA抗体を産生させ、その乳汁を子豚に飲ませることにより、子豚の腸管表面をその抗体で保護する方法が行われている。

【0008】しかし、この方法によるワクチネーションは、必ずしも十分に抗体を上昇させる方法として確立されたものではない。また、分娩日の異なる母豚を、分娩時に最良の免疫状態に保つためには、ワクチン接種にあたり分娩日を勘案する必要があることから、極めて繁雑なものである。

【0009】以上のように、上記コロナウイルスに起因する感染症においても、免疫の賦与による感染の阻止は、現在のところ完全とはいえない。そのため、コロナウイルスの感染を有効に防ぎ、さらに生体に対して有害な副作用を持たず、安心して使用できる薬剤の開発が望まれている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題、すなわちオーエスキーボウイルスや牛伝染性鼻気管炎ウイルスなどのヘルペスウイルス並びに豚伝染性胃腸炎ウイルスや豚流行性下痢ウイルスなどのコロナウイルスの感染を有効に阻止すると共に、生体に対して有害な副作用を示す心配のない薬剤を開発すべく、鋭意検討を行った。

【0011】本発明では、生体に対する安全性を重視する観点から、化学合成品ではなく、天然物の中から目的とする薬効を有する物質を検索すべく研究を重ねた。その結果、茶の抽出物である茶ポリフェノール類が、上記ウイルスの感染を阻止する作用があることを見出し、かかる知見に基づいて本発明に到達した。

【0012】請求項1記載の本発明は、茶ポリフェノール類を有効成分として含有することを特徴とする家畜のヘルペスウイルスまたはコロナウイルス感染予防剤である。請求項2記載の本発明は、ヘルペスウイルスが、オーエスキーボウイルスまたは牛伝染性鼻気管炎ウイルスである請求項1記載のウイルス感染予防剤である。請求項3記載の本発明は、コロナウイルスが、豚伝染性胃腸炎ウイルスまたは豚流行性下痢ウイルスである請求項1記載のウイルス感染予防剤である。請求項4記載の本発明は、請求項1記載のウイルス感染予防剤を、家畜の飼料または飲み水に加えて家畜に投与することを特徴とす

(3) 開2000-44473 (P2000-4BA)

る家畜のウイルス感染予防法である。請求項5記載の本発明は、請求項1記載のウイルス感染予防剤を、家畜の皮膚に散布することを特徴とする家畜のウイルス感染予防法である。

【0013】

【発明の実施の形態】以下に、本発明について詳細に説明する。本発明の感染予防剤は、茶ポリフェノール類を有効成分とするものである。茶ポリフェノール類は、茶に含まれている物質である。ここで茶とは、茶樹 (*Camellia sinensis*) から得られる葉、茎、木部、根、実またはこれらの混合物であるが、飲用茶葉が一般的である。飲用茶葉には、その製法により様々な種類がある。例えば、紅茶、プーアル茶等の発酵茶、ウーロン茶、包種茶等の半発酵茶、緑茶、釜煎り緑茶、ほうじ茶等の不発酵茶並びにこれらの混合物が挙げられる。これらの茶葉は、いずれも茶ポリフェノール類を含有している。

【0014】本発明において、茶ポリフェノール類としては、茶自身を使用できるが、好ましくは茶から水、熱水、有機溶媒、含水有機溶媒等により抽出して得た茶抽出物を用いる。また、該茶抽出物を、有機溶媒分画や吸着樹脂等を用いてさらに所望の程度に精製して得られる茶ポリフェノール高含有物を用いることもできる。このような抽出、精製等の方法については、例えば特公平1-44234号公報、同2-12474号公報、同2-22755号公報、特開平4-20589号公報、同5-260907号公報、同8-109178号公報に記載の方法を採用することができる。

【0015】茶ポリフェノール類としては、カテキン類やテアフラビン類を挙げることができる。カテキン類の例としては、(+) - カテキン、(-) - カテキン、(+)-ガロカテキン、(+)-エピガロカテキン、(+)-ガロカテキンガレート、(+)-エピガロカテキンガレート、(-)-エピカテキン、(-)-エピカテキンガレート、(-)-カテキンガレート、(-)-エピガロカテキン、(-)-ガロカテキン、(-)-エピガロカテキンガレートなどがある。テアフラビン類の例としては、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB、テアフラビンジガレート、遊離型テアフラビンなどがある。本発明においては、これらの茶ポリフェノール類を単独もしくは2種以上を組み合わせて用いる。

【0016】茶ポリフェノール類は、市販品を使用することもできる。カテキン類を主成分とする市販品としては、商品名：ポリフェノン60（三井農林株式会社製、茶ポリフェノール含量60%以上）、商品名：ポリフェノン30（三井農林株式会社製、茶ポリフェノール含量30%以上）、商品名：ポリフェノン70S（三井農林株式会社製、茶ポリフェノール含量70%以上）等がある。また、テアフラビン類を主成分とする市販品としては、商品名：ポリフェノンTF（三井農林株式会社製、

組成：テアフラビン 16.8%、テアフラビンモノガレートA 19.5%、テアフラビンモノガレートB 16.1%、テアフラビンジガレート 31.4%）等がある。

【0017】前記したように、本発明に係る家畜のウイルス感染予防剤の適用対象となるウイルスは、ヘルペスウイルスおよびコロナウイルスである。ヘルペスウイルスとしては、請求項2記載の本発明に示した如く、オースキー病ウイルス（ADウイルス）、牛伝染性鼻氣管炎ウイルス（IBRウイルス）が挙げられる。また、コロナウイルスとしては、請求項3記載の本発明に示した如く、豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEウイルス）、豚流行性下痢ウイルス（PEDウイルス）が挙げられる。

【0018】本発明のウイルス感染予防剤が、これらのウイルスに対して感染予防効果を発揮する具体的なメカニズムについては、まだ明らかではない。一般に、動物細胞に感染し増殖するウイルスは、その感染開始時において、細胞膜上の物質（主に糖タンパク）をレセプターとして利用する。すなわち、このレセプターに対し、該ウイルス粒子表面に存在する特定のタンパク（binding protein）が特異的に結合する。結合したウイルスは、細胞質内に取り込まれ、感染が成立する。したがって、上記binding proteinの活性を抑制すること、あるいは細胞膜上のレセプターの活性を抑制することにより、ウイルス感染を阻止することができるものと考えられる。

【0019】本発明のウイルス感染予防剤の使用形態は様々であり、制限されないが、請求項4、5に記載したように、家畜の飼料または飲み水に加えて家畜に投与したり、家畜の皮膚に散布する方法が主な形態である。家畜の皮膚に散布する方法としては、畜舎等の上方から散水する水（細霧）にウイルス感染予防剤を混合する方法などがある。細霧は、主に豚等の家畜の体温を低下させる目的で行われるが、これによりウイルスの感染を阻止して病気の蔓延を防止することができる。したがって、剤形についても特別な制限はなく、茶ポリフェノール類を有効成分として含有していればよい。一般的には、液剤や散剤の形で用いられる。なお、通常の薬剤に使用される添加剤や補助成分、例えば希釈剤、增量剤、賦形剤等を適宜組み合わせて用いることができる。

【0020】本発明のウイルス感染予防剤において、有効成分である茶ポリフェノール類の配合量は、対象とするウイルスの種類、薬剤の投与形態、家畜の年齢や健康状態等、さらには畜舎等の環境などを考慮して適宜決定すればよい。例えば、家畜の飼料または飲み水に加える場合は、0.01～1.0%、好ましくは0.1～0.6%が適当である。一方、散水用の水に添加する場合は、0.01～0.6%程度が適当である。なお、茶ポリフェノール類は、日常的に飲用されている茶の成分であることから、家畜に対しても安全性の点で何ら心配がない。したがって、上記の量を超えて投与可能である上

(4) 開2000-44473 (P2000-4CA)

に、長期間にわたって連続的に投与することもできる。

【0021】

【実施例】次に、本発明を実施例により説明する。実施例で用いたウイルスおよび茶抽出物は、以下の通りである。

a) ウイルス

- ・ヘルペスウイルス

- オーエスキーボウイルス (ADウイルス)

- 牛伝染性鼻氣管炎ウイルス (IBRウイルス)

- ・コロナウイルス

- 豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEウイルス)

- 豚流行性下痢ウイルス (PEDウイルス)

【0022】b) 茶抽出物

商品名：ポリフェノン70S（三井農林株式会社製）をPBSで10mg/mlとなるように溶解したもの

【0023】c) 培養に用いた細胞

各ウイルスについて異なる細胞を用いた。

- ・ADウイルス、TGEウイルス：ブタ腎由来株化細胞 (CPK細胞)

- ・IBRウイルス：ウシ腎由来株化細胞 (MDBK細胞)

- ・PEDウイルス：サル腎由来株化細胞 (Vero細胞)

なお、これらの細胞は、細胞増殖培地（血清およびトリプトースフォスフェートプロスを含むイーグル培地）で増殖させたものを試験に用いた。

$$\text{感染性阻止率 (\%)} = \frac{\text{CPEが出現したウェル数}}{\text{材料を接種したウェル数}} \times 100$$

【0027】

第1表〔100%感染阻止に必要な茶抽出物の用量〕

ウイルス	茶抽出物用量
ADウイルス	1 μg/ml
IBRウイルス	0.1 μg/ml

【0028】図1および図2より、各ヘルペスウイルスの茶抽出物処置液は、茶抽出物の用量が増えるにつれて、細胞に対する感染性を失うこと、すなわち感染性阻止効果が用量依存性であることが明らかである。そして、第1表に示したように、濃度1μg/mlの茶抽出物で処置することにより、ADウイルスの感染性を100%阻止できることが判明した。また、同様に、IBRウイルスの感染性は、わずか0.1μg/mlの茶抽出物により阻止されることが判明した。したがって、茶抽出物でヘルペスウイルスを直接処置することにより、その感染を阻止することが可能であり、特に所定の用量以上用いれば、短時間の処置で100%感染阻止可能であることが分かる。

【0024】実施例1〔茶抽出物で処置したヘルペスウイルスの感染性〕

茶抽出物でヘルペスウイルスを処置することにより、感染性を阻止できるか否かについて調べた。茶抽出物を0μg/ml、0.1μg/ml、0.3μg/ml、1μg/ml、3μg/ml、10μg/mlとなるよう PBSに溶解した。一方、ヘルペスウイルス (ADウイルス、IBRウイルス) を100TCID₅₀となるよう PBSで希釈した。ここで、100TCID₅₀とは、ウイルスの量を示し、培養細胞のうち50%に感染を生じさせるウイルスの100倍量であることを意味する。

【0025】上記各種濃度の茶抽出物にヘルペスウイルス (ADウイルス、IBRウイルス) を加え30分処置した後、得られた各ウイルスの処置液を細胞培養ウェルに接種し、37°Cで5~7日間培養した。細胞培養を光学顕微鏡で観察し、ウイルス感染の指標となるCPE (細胞変性効果) の出現の有無を調べ、以下の式により感染性阻止率を算出した。なお、CPEとは、ウイルスの増殖により生じた培養細胞の形態的変化のことであり、細胞培養におけるウイルスの増殖の有無を知る最も直接的な方法である。茶抽出物の用量とウイルス感染性阻止率の関係を図1、図2に示す。また、ウイルス感染を100%阻止した茶抽出物の用量を第1表に示す。

【0026】

【数1】

【表1】

【0029】実施例2〔感染前細胞に対する茶抽出物処理の効果〕

感染前の細胞を茶抽出物で前処理することにより、ヘルペスウイルスの感染を阻止できるか否かを検討した。茶抽出液をPBSで100μg/mlまたは300μg/mlに希釈したものを用意し、これにブタ腎由来株化細胞 (CPK細胞) を30分浸漬処理した。この処理細胞にADウイルスを感染させ、感染の有無を調べた。

【0030】また、細胞をウシ腎由来株化細胞 (MDBK細胞) に、ウイルスをIBRウイルスに代えて、上記と同様に試験を行った。各試験の結果得られたウイルス感染阻止率 (%) を第2表に示す。

【0031】

(5) 開2000-44473 (P2000-47=A)

【表2】

第2表〔感染前細胞に対する茶抽出物処理の効果〕

ウイルス	茶抽出物の用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	100	300
ADウイルス	75%	100%
IBRウイルス	87.5%	100%

【0032】第2表から明らかなように、茶抽出物で感染前の細胞を前処理することにより、ヘルペスウイルスの感染を効果的に阻止できることが確認された。このことから、本発明の感染予防剤は、正常の細胞の感染を未然に予防することができる事が判明した。

【0033】実施例3〔茶抽出物で処置したコロナウイルスの感染性〕

実施例1において、ADウイルスをTGEウイルスに、

またIBRウイルスをPEDウイルスに、MDBK細胞をVero細胞に代えたこと以外は、実施例1と同様に試験を行った。茶抽出物の用量と各ウイルス感染性阻止率の関係を図3、図4に示す。また、ウイルス感染を100%阻止した茶抽出物の用量を第3表に示す。

【0034】

【表3】

第3表〔100%感染阻止に必要な茶抽出物の用量〕

ウイルス	茶抽出物の用量
TGEウイルス	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PEDウイルス	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

【0035】図3および図4より、各コロナウイルスを茶抽出物で処置すると、茶抽出物の用量が増えるにつれて、細胞に対するウイルスの感染性が失われる事、すなわち感染性阻止が用量依存性である事が明らかである。さらに、第3表に示すように、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の茶抽出物でウイルスを処置すれば、各ウイルスの感染を100%阻止する事ができる。このことから、本発明の感染予防剤は、ヘルペスウイルスのみならず、コロナウイルスに対しても同様に感染阻止効果を示す事が判明した。

【0036】実施例4〔感染前細胞に対する茶抽出物処理の効果〕

実施例2において、ADウイルスをTGEウイルスに、またIBRウイルスをPEDウイルスに、MDBK細胞をVero細胞に代えたこと並びに茶抽出物の濃度を30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ としたこと以外は、実施例2と同様に行った。その結果得られたウイルス感染阻止率を第4表に示す。

【0037】

【表4】

第4表〔コロナウイルス感染阻止率〕

ウイルス	茶抽出物の用量	
	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
TGEウイルス	25%	100%
PEDウイルス	87.5%	100%

【0038】第4表から、茶抽出物による感染前細胞の処理による効果がわかる。すなわち、TGEウイルスに対しては濃度が30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では十分な感染阻止率が

得られないが、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では完全な感染阻止効果を示す。また、PEDウイルスに対しては、濃度が30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも十分な感染阻止率を示し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(6) 開2000-44473 (P2000-4 (<A))

Iでは完全な感染阻止効果を示す。このことから、正常細胞を予め茶抽出物で処理することによって、コロナウイルスに対して優れた感染阻止効果を示すことが分かる。

【0039】

【発明の効果】本発明のウイルス感染予防剤は、家畜の飼料や飲み水等に配合して投与することにより、ヘルペスウイルスおよびコロナウイルスの感染を有効に防ぐことができる。また、受精卵・精液等の洗浄に利用したり、さらには畜舎の消毒等に用いてもよく、環境を汚染せず、しかも低用量で上記ウイルスの感染を阻止することができる。しかも、このウイルス感染予防剤の有効成分は、人間により日常相当量飲用されている天然物由来

のものであるため、薬剤として生体に適用しても安全性の面で全く問題がなく、長期間の使用による弊害もない。

【図面の簡単な説明】

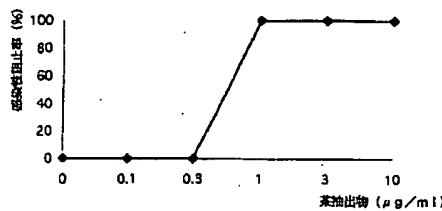
【図1】 本発明の感染予防剤のADウイルスに対する感染阻止効果を示すグラフである。

【図2】 本発明の感染予防剤のIBRウイルスに対する感染阻止効果を示すグラフである。

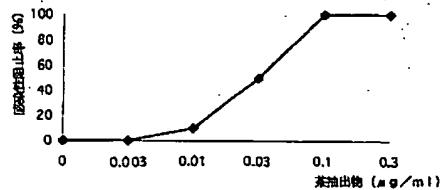
【図3】 本発明の感染予防剤のTGEウイルスに対する感染阻止効果を示すグラフである。

【図4】 本発明の感染予防剤のPEDウイルスに対する感染阻止効果を示すグラフである。

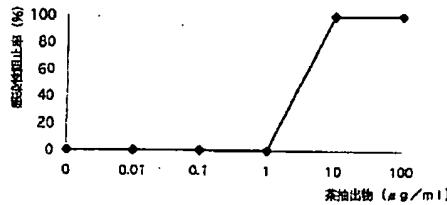
【図1】



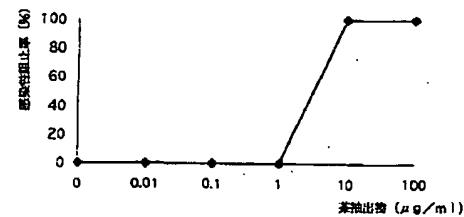
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2B150 AA01 AA02 AA03 AB10 DB01
DD31 DD42
4C062 FF44 FF56
4C086 AA01 AA02 BA08 MA08 ZB33
ZC61
4C088 AB45 BA08 BA09 ZB33